

令和元年6月25日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09548

研究課題名(和文) 肺癌治療における免疫チェックポイント阻害剤のバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Analysis of molecular factor to influence of immuno-checkpoint inhibitor in lung cancer treatment

研究代表者

高山 浩一 (Takayama, Koichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50274444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は免疫チェックポイント阻害剤の効果を予測する因子の探索である。まず、肺癌の外科切除検体を用いて腫瘍組織へのリンパ球浸潤をCD3、CD8、Foxp3の各抗体で免疫染色し、イメージアナライザーで定量化した。リンパ球浸潤との相関を検討する腫瘍側因子(p53、PD-L1、VEGF)をそれぞれ免疫染色により定量化した。CD8陽性Tリンパ球およびFoxp3陽性Tリンパ球の浸潤とp53およびVEGFの発現に有意な相関はみられなかった。一方、腫瘍細胞におけるPD-L1の発現はFoxp3陽性Tリンパ球の浸潤と相関しており、PD-L1を介した腫瘍細胞による制御性Tリンパ球の誘導が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤は現在肺癌だけでなく、多くの癌の治療に広く使用されている。その有効性を予測する因子としてPD-L1の発現が用いられているが、高発現例でも効果を全く認めない場合もあり、より正確なバイオマーカーが求められている。新規バイオマーカーが発見されれば、有効性が期待できる患者にのみ同薬剤を使用することで、無駄な治療を避けることができ、医療経済の効率化にもつながる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to finding the predictive marker for immune-checkpoint inhibitor in cancer treatment. Surgically resected lung cancer specimens were used to evaluate the tumor factors including p53, PD-L1 and VEGF. Also, tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were calculated by image analyzer automatically. Cytotoxic T-lymphocyte and regulatory T-lymphocyte were identified by immunohistochemical staining by CD8 antibody and Foxp3 antibody, respectively. In result, TIL were not associated with p53 or VEGF expression. However, tumor PD-L1 expression is associated with Foxp3 positive T-lymphocyte, suggesting regulatory T-lymphocyte induction by PD-L1.

研究分野：呼吸器腫瘍

キーワード：肺癌 免疫チェックポイント阻害剤 効果予測因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤は進行肺がんの治療には必須の薬剤として広く一般臨床において使用されている。その効果を予測する因子としてPD-L1の発現がバイオマーカーとされているが、必ずしもその精度は高くない。また、免疫チェックポイント阻害剤が抗腫瘍効果を発揮するにはまず腫瘍内もしくは近傍にリンパ球が浸潤している必要があり、実際にリンパ球浸潤の有無は治療効果予測因子である。しかしながら、腫瘍へのリンパ球浸潤にどのような因子が影響しているのか不明である。

2. 研究の目的

腫瘍内リンパ球浸潤を指標として免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子を探索する。

3. 研究の方法

京都府立医科大学附属病院呼吸器外科にて外科切除を行った肺癌症例のうち病理レポートにて腫瘍部へのリンパ球浸潤を認める検体を対象とした。腫瘍へのリンパ球浸潤についてはイメージアナライザー (Software: ImageJ 1.50e) により定量化を行った (図1: 測定した腫瘍部位のリンパ球免疫染色 左: 顕微鏡下に研究分担者が同定 右: イメージアナライザーによる同定)。最も浸潤程度の強い部位を評価部位とし、部位の選択については研究分担者と2名で判定した。各種リンパ球の同定は以下の抗体を用いた免疫染色により実施した。全リンパ球: 抗CD3抗体 F7.2.38 (Dako)、ヘルパーTリンパ球: 抗CD4抗体 SP35 (Roche)、細胞障害性Tリンパ球: 抗CD8抗体 CB/144B (Dako)、制御性Tリンパ球: 抗Foxp3抗体 236A/E7 (abcam)。腫瘍由来の探索因子は以下の抗体を用いた免疫染色により実施した。抗PD-L1抗体: SP263 (Roche)、抗PD-1抗体: NAT105 (abcam)、抗p53抗体: D0-7 (Dako)、抗VEGF抗体: c-7269 (Santa Cruz)。p53蛋白の発現については抗p53抗体による免疫染色で評価し、染色強度によって0(陰性)、1(弱陽性)、2(強陽性)の3段階で評価を行った。同様にPD-L1蛋白の発現についても染色強度によって0(陰性)、1(弱陽性)、2(強陽性)の3段階で評価を行った (図3上段: p53蛋白の免疫染色 下段: PD-L1蛋白の免疫染色)。VEGFの発現に関しては過去の報告に従い免疫染色の染色強度により、陰性0、弱陽性1、中等度陽性2、強陽性3に分類した。また陽性細胞の数から0(0%)、1(1-25%)、2(26-50%)、3(>50%)とし、染色強度と陽性細胞の積によってVEGF発現を定量化した。また、腫瘍由来のVEGFが機能していることを確認するため、腫瘍内の血管密度を測定した。血管密度は抗CD31抗体による血管内皮細胞の免疫染色により血管を同定して算出した。

4. 研究成果

腫瘍浸潤リンパ球の定量化については研究分担者が顕微鏡下に計測したリンパ球数とイメージアナライザーによる計測値を比較し、良好な相関を認めた (図2: 顕微鏡下の計測値とイメージアナライザーによる計測値の相関)。全リンパ球中に占める制御性T細胞の割合は0.3%から1.4%であった。さらに、リンパ球の浸潤を腫瘍内部と腫瘍周辺に分けて計測したところ、全リンパ球では腫瘍内部が優勢であったものが62.5%であり、制御性Tリンパ球では75%であった。各リンパ球浸潤数の中央値で2群に分けて臨床背景因子(年齢、性別、臨床病期、組織型等)を比較したが有意な偏りはみられなかった。

p53蛋白の発現については陰性50%、弱陽性12.5%、強陽性37.5%であり、既報と同等の染色性であった。また、PD-L1については陰性37.5%、弱陽性20%、強陽性37.5%であり、こちらも既報と同等の染色性であった。p53蛋白の発現とリンパ球の浸潤に関して全リンパ球、CD8陽性Tリンパ球、Foxp3陽性Tリンパ球に分けて、相関の有無を統計学的に検討したが、どの群においても有意な相関を認めなかった。次にPD-L1蛋白の発現との相関について検討を行った。その結果、全リンパ球、CD8陽性Tリンパ球の浸潤については相関を認めなかったものの、Foxp3陽性Tリンパ球との間には正の相関が認められ ($R^2=0.65$)、PD-L1の発現が強い腫瘍組織ほどFoxp3陽性Tリンパ球の浸潤が強かった。このことは、腫瘍由来のPD-L1がナイーブTリンパ球を制御性Tリンパ球へ誘導している可能性を示唆しており、腫瘍を免疫寛容状態へ誘導しているものと推測された。VEGF強発現群(スコア5以上)では低発現群(スコア0-4)に比較して血管密度が有意に高く ($p=0.0003$)、VEGFの生理活性が示された。しかしながら、全リンパ球の浸潤に関してはVEGF強発現群で少ない傾向にはあったものの、有意差を認めなかった。CD8陽性Tリンパ球、Foxp3陽性Tリンパ球についても同様に解析を行ったが有意な相関を認めなかった。

腫瘍内のゲノムの安定性はp53蛋白を代表とするがん抑制性の蛋白や傷害を受けた遺伝子を修復する酵素によって保たれていることから、本研究では特にp53蛋白と腫瘍内へのリンパ球浸潤の関連を検討したが、有意な相関を認めずバイオマーカーとしての有用性は乏しいと結論した。

図1 (左: 顕微鏡下に目視で測定 右: イメージアナライザーによる自動測定)

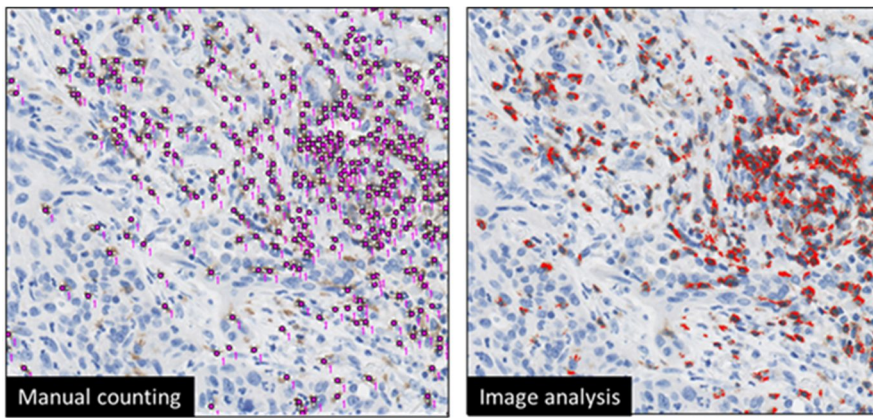


図 2

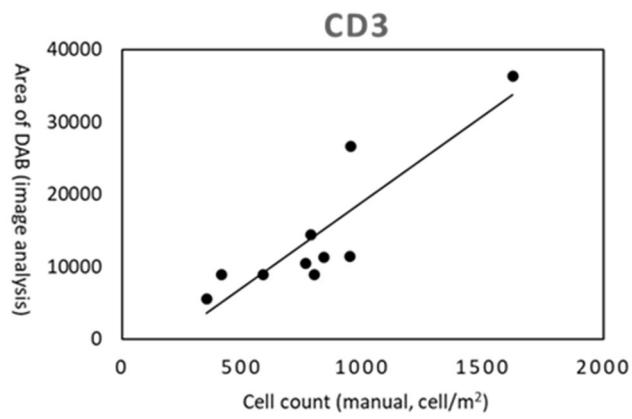
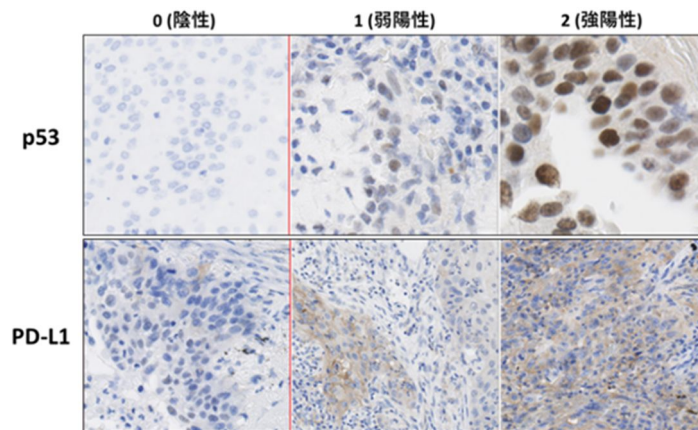


図 3 上段：p53 蛋白の免疫染色 下段：PD-L1 蛋白の免疫染色



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：井上匡美
ローマ字氏名：INOUE MASAYOSHI
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：10379232

研究分担者氏名：金子美子
ローマ字氏名：KANEKO YOSHIKO
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：30768825

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：谷村恵子
ローマ字氏名：TANIMURA KEIKO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。